PROGENIE MOLECULAR

CE

RealCycler®

Progenie molecular
Artes y Oficios 37. Valencia 46021. España. Tel. 902 91 05 05 Fax 902 91 05 06
www.progenie-molecular.com

MEBAVI-G v.1

1 Uso previsto

RealCycler MEBAVI-G es un kit de reactivos que permite la detección cualitativa por PCR a tiempo real del ADN de *Neisseria meningitidis* (meningococo), *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), *Listeria monocytogenes,* Virus Herpes Simple (tipo 1 + tipo 2), Virus Varicela-Zoster y del ARN de Enterovirus en muestras clínicas. El sistema incluye un control interno de amplificación para prevenir los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción.

2 Especificaciones

- **Sensibilidad:** 10 copias/µL *Neisseria meningitidis,* 100 copias/µL *Streptococcus pneumoniae*, 1 copia/µL *Listeria monocytogenes*, 1 copia/µL Enterovirus, 10 copias/µL Herpesvirus tipo 1, 100 copias/µL Herpesvirus tipo 2 y 100 copias/µL Virus Varicela-Zoster .
- **Especificidad:** *Neisseria meningitidis* (gen ctrA), *Streptococcus pneumoniae* (gen ply), *Listeria monocytogenes* (gen hlyA), Enterovirus (Gen poliproteína), Herpesvirus tipo 1 (Genes US4 y US5), Herpesvirus tipo 2 (Gen DNA polimerasa) y Virus Varicela-Zoster (Gen Single-stranted DNA-binding protein (ORF 29)).

3 Estabilidad y almacenamiento

Todos los componentes del kit *RealCycler* MEBAVI-G deben ser almacenados a -20ºC.
El kit es estable a - 20ºC hasta la fecha de caducidad (ver etiqueta externa del kit).

4 Descripción del método

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de una región específica del genoma del patógeno usando primers y sondas específicos. En la PCR a tiempo real se utilizan sondas marcadas con fluorocromos. Hay una emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ADN/ARN presente en la muestra. El *Cycle threshold* (Ct) es el ciclo de la PCR en el que se detecta inicialmente un aumento en la señal de fluorescencia. En la amplificación de MENELI, *Neisseria meningitidis* se detecta en FAM, *Streptococcus pneumoniae* en TxR, *Listeria monocytogenes* en Alx647 y el control interno en Alx532.
En la amplificación de ENHEVA, Enterovirus se detecta en FAM, Virus Herpes Simple (tipo 1 + tipo 2) en TxR, Virus Varicela-Zoster en Alx647 y el control interno en Alx532.

5 Composición

RealCycler MEBAVI-G incluye las mezclas de reacción **Amplimix MENELI** y **Amplimix ENHEVA**, una **retrotranscriptasa**, un **Control Positivo ADN *N. meningitidis***, un **Control Positivo ADN *S. pneumoniae***, un **Control Positivo ADN *Listeria***, un **Control Positivo ARN Enterovirus**, un **Control Positivo ADN Herpes** y un **Control Positivo ADN VZV**. Todos los reactivos están listos para su uso sin añadir ni reconstituir ningún componente.

Componente	Viales	Núm.	Volumen	Conserv.
AmpliMix MENELI-G		1	470 µL	-15 /-25 ºC
AmpliMix ENHEVA-G		1	460 µL	-15 /-25ºC

Componente	Viales	Núm.	Volumen	Conserv.
Retrotrans-criptasa		1	7 µL	-15 /-25 ºC
Control Positivo ADN *N. meningitidis*		1	30 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ADN *S. pneumoniae*		1	30 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ADN *Listeria*		1	30 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ARN Enterovirus		1	30 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ADN Herpes		1	30 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ADN VZV		1	30 µL	-15 /-25ºC

6 Material y equipamiento adicional requerido y no suministrado

- Equipo de PCR a tiempo real
- Kit de extracción de ADN/ARN
- Guantes desechables
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta con filtro
- Congelador (-20ºC)

7 Advertencias y precauciones

- Todos los componentes del kit deben mantenerse en frío mientras se están manipulando.
- Después de añadir el ADN/ARN, minimizar el tiempo necesario para iniciar el programa de amplificación.
- Los tubos con la mezcla de amplificación no deben exponerse a la luz durante un periodo de tiempo prolongado.
- Descongelar y congelar repetidas veces los reactivos puede disminuir la sensibilidad del kit.
- Usar guantes desechables.
- Usar pipetas calibradas y puntas de pipeta con filtro.
- Los ensayos deben llevarse a cabo por personal cualificado y siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Uso para diagnóstico *in vitro*.
- QIAamp es una marca registrada del Grupo QIAGEN.
- Maxwell® es una marca registrada de Promega Corporation.
- NucliSENS® easyMAG® es una marca registrada de bioMérieux.

8 Muestras clínicas

- Recoger las muestras en tubos estériles.
- Almacenarlas y transportarlas congeladas a -20ºC hasta su uso.
- Utilizar ADN/ARN bien purificado y libre de inhibidores de la PCR.

9 Procedimiento

a) Extracción de ADN/ARN

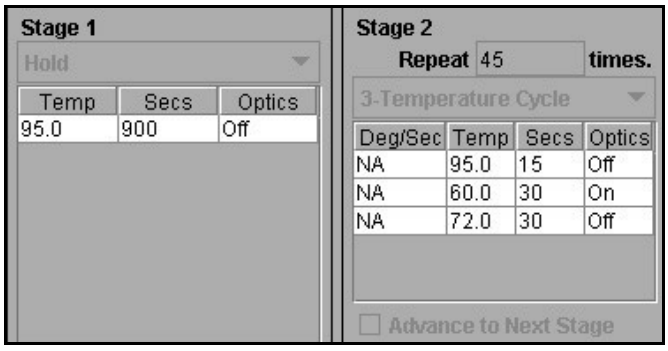
El ADN y ARN se debe extraer de las muestras clínicas utilizando un procedimiento de extracción adecuado. Hay diferentes kits de extracción de ADN/ARN disponibles de distintos fabricantes. Habitualmente los sistemas utilizados para la extracción de ARN son más adecuados para la extracción simultánea de ADN y ARN que los utilizados para la extracción de ADN. El volumen de la muestra depende del protocolo utilizado. Realizar el procedimiento de extracción de ADN/ARN siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este kit ha sido validado con los siguientes sistemas de extracción:
- QIAamp DNA Blood Mini kit (referencias 51104, 51106). QIAGEN.
- QIAamp VIRAL RNA Mini kit (referencias 52904, 52906). QIAGEN.
- Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification kit (referencia AS1140). Promega Corporation.

Este kit puede ser utilizado con los siguientes sistemas de extracción:
- BioRobot EZ1.QIAGEN.
- QIAcube. QIAGEN.
- NucliSENS® easyMAG®. bioMérieux

Procedimiento MENELI-G

b) Protocolo



Selección de fluoróforos:
- FAM: detecta *Neisseria meningitidis*
- TxR: detecta *Streptococcus pneumoniae*
- Alx647: detecta *Listeria monocytogenes.*
- Alx532: detecta el control interno.

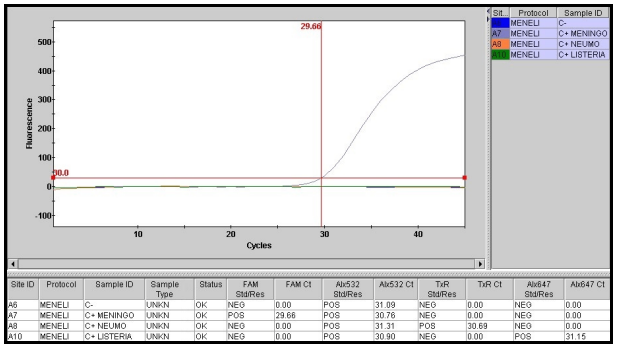
c) Preparación de la reacción

- Descongelar la **AmpliMix** y los **Controles Positivos *N.meningitidis***, ***S.pneumoniae*** y ***Listeria***.
- Tomar una alícuota de **19 µL** de Amplimix y añadir **6 µL** del ADN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo.
- Seleccionar el protocolo “MENELI-G”.
- Iniciar el programa de amplificación.

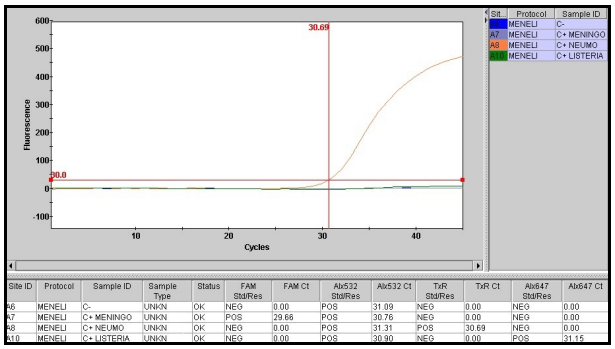
d) Interpretación de los resultados

FAM Std/Res	TxR Std/Res	Alx647 Std/Res	Alx532 Std/Res	Interpretación
POS	ND	ND	Indiferente	POSITIVO *N. meningitidis*
ND	POS	ND	Indiferente	POSITIVO *S. pneumoniae*
ND	ND	POS	Indiferente	POSITIVO *Listeria*
POS	POS	ND	Indiferente	POSITIVO *N. meningitidis* y *S. pneumoniae*
POS	ND	POS	Indiferente	POSITIVO *N. meningitidis* y *Listeria*
ND	POS	POS	Indiferente	POSITIVO *S. pneumoniae* y *Listeria*
POS	POS	POS	Indiferente	POSITIVO *N. meningitidis, S. pneumoniae* y *Listeria*
ND	ND	ND	POS	NO SE DETECTA
ND	ND	ND	ND	NO VALORABLE

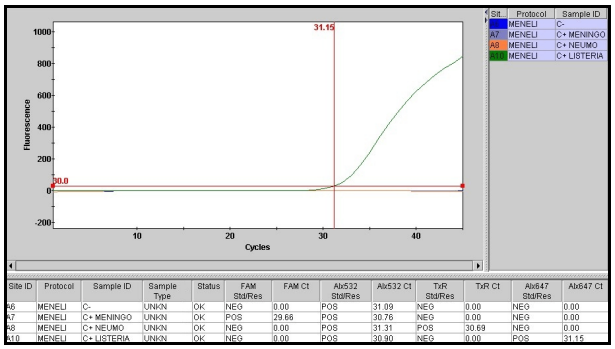
e) Ejemplo de resultado



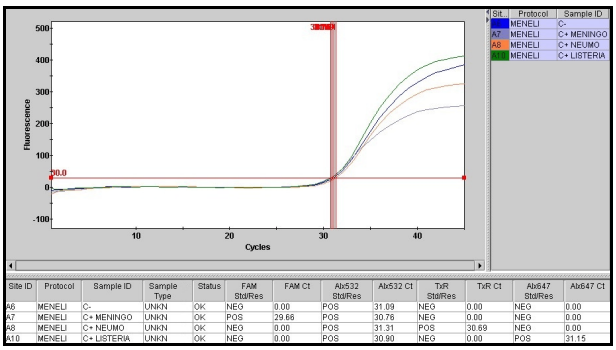
Gráfica 1 (Canal FAM: *N. meningitidis*): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo *N.meningitidis*, un control positivo *S.pneumoniae* y un control positivo *Listeria*. Control negativo (A6 en azul): ausencia de señal. Control positivo *N.meningitidis* (A7 en gris): se observa una señal con Ct=29,66. Control positivo *S.pneumoniae* (A8 en naranja): ausencia de señal. Control positivo *Listeria* (A10 en verde): ausencia de señal.



Gráfica 2 (Canal TxR: *S. pneumoniae*): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo *N.meningitidis,* un control positivo *S. pneumoniae* y un control positivo *Listeria*. Control negativo (A6 en azul): ausencia de señal. Control positivo *N.meningitidis* (A7 en gris): ausencia de señal. Control positivo *S.pneumoniae* (A8 en naranja): se observa una señal con Ct=30,69. Control positivo *Listeria* (A10 en verde): ausencia de señal.



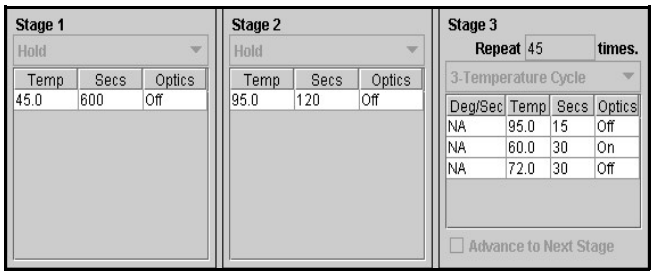
Gráfica 3 (Canal Alx647: *Listeria*): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo *N.meningitidis,* un control positivo *S. pneumoniae* y un control positivo *Listeria*. Control negativo (A6 en azul): ausencia de señal. Control positivo *N.meningitidis* (A7 en gris): ausencia de señal. Control positivo *S.pneumoniae* (A8 en naranja): ausencia de señal. Control positivo *Listeria* (A10 en verde): se observa una señal con Ct=31,15.



Gráfica 4 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo *N.meningitidis,* un control positivo *S. pneumoniae* y un control positivo *Listeria*. Control negativo (A6 en azul): se observa una señal con Ct=31,09. Control positivo *N.meningitidis* (A7 en gris): se observa una señal con Ct=30,76. Control positivo *S.pneumoniae* (A8 en naranja): se observa una señal con Ct=31,31. Control positivo *Listeria* (A10 en verde): se observa una señal con Ct=30,90.

Procedimiento ENHEVA-G

b) Protocolo



Selección de fluoróforos:
- FAM: detecta Enterovirus
- TxR: detecta Virus Herpes Simple (tipo 1 + tipo 2)
- Alx647: detecta Virus Varicela-Zoster.
- Alx532: detecta el control interno.

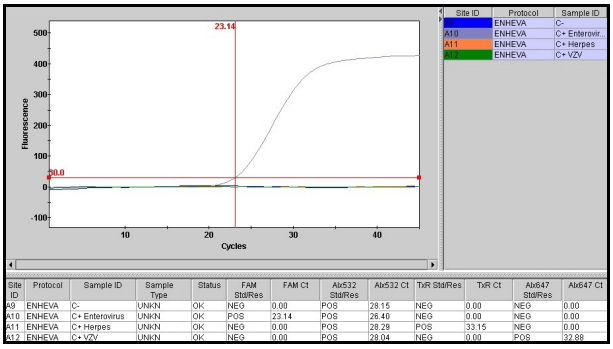
c) Preparación de la reacción

- Descongelar la **AmpliMix** y los **Controles Positivos Enterovirus, Herpes** y **VZV**.
- Tomar una alícuota de **18,5 µL** de Amplimix, añadir **0,25 µL** de **retrotranscriptasa** y añadir **6,5 µL** del ADN/ARN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo.
- Seleccionar el protocolo “ENHEVA-G”.
- Iniciar el programa de amplificación.

d) Interpretación de los resultados

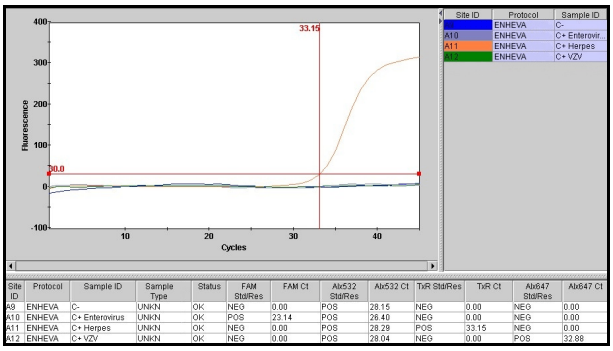
FAM Std/Res	TxR Std/Res	Alx647 Std/Res	Alx532 Std/Res	Interpretación
POS	ND	ND	Indiferente	POSITIVO Enterovirus
ND	POS	ND	Indiferente	POSITIVO Herpes
ND	ND	POS	Indiferente	POSITIVO VZV
POS	POS	ND	Indiferente	POSITIVO Enterovirus y Herpes
POS	ND	POS	Indiferente	POSITIVO Enterovirus y VZV
ND	POS	POS	Indiferente	POSITIVO Herpes y VZV
POS	POS	POS	Indiferente	POSITIVO Enterovirus, Herpes y VZV
ND	ND	ND	POS	NO SE DETECTA
ND	ND	ND	ND	NO VALORABLE

e) Ejemplo de resultado



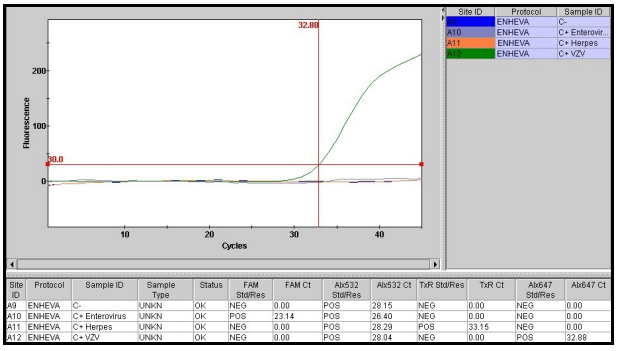
Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A9	ENHEVA	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	28.15	NEG	0.00	NEG	0.00
A10	ENHEVA	C+ Enterovirus	UNKN	OK	POS	23.14	POS	26.40	NEG	0.00	NEG	0.00
A11	ENHEVA	C+ Herpes	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	28.29	POS	33.15	NEG	0.00
A12	ENHEVA	C+ VZV	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	28.04	NEG	0.00	POS	32.88

Gráfica 1 (Canal FAM: Enterovirus): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo Enterovirus, un control positivo Herpes y un control positivo VZV. Control negativo (A9 en azul): ausencia de señal. Control positivo Enterovirus (A10 en gris): se observa una señal con Ct=23,14. Control positivo Herpes (A11 en naranja): ausencia de señal. Control positivo VZV (A12 en verde): ausencia de señal.



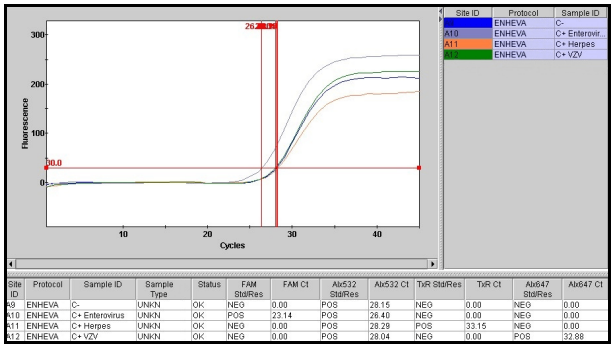
Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A9	ENHEVA	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	28.15	NEG	0.00	NEG	0.00
A10	ENHEVA	C+ Enterovirus	UNKN	OK	POS	23.14	POS	26.40	NEG	0.00	NEG	0.00
A11	ENHEVA	C+ Herpes	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	28.29	POS	33.15	NEG	0.00
A12	ENHEVA	C+ VZV	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	28.04	NEG	0.00	POS	32.88

Gráfica 2 (Canal TxR: Herpes): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo Enterovirus, un control positivo Herpes y un control positivo VZV. Control negativo (A9 en azul): ausencia de señal. Control positivo Enterovirus (A10 en gris):ausencia de señal. Control positivo Herpes (A11 en naranja): se observa una señal con Ct=33,15. Control positivo VZV (A12 en verde): ausencia de señal.



Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A9	ENHEVA	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	28.15	NEG	0.00	NEG	0.00
A10	ENHEVA	C+ Enterovirus	UNKN	OK	POS	23.14	POS	26.40	NEG	0.00	NEG	0.00
A11	ENHEVA	C+ Herpes	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	28.29	POS	33.15	NEG	0.00
A12	ENHEVA	C+ VZV	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	28.04	NEG	0.00	POS	32.88

Gráfica 3 (Canal Alx647: VZV): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo Enterovirus, un control positivo Herpes y un control positivo VZV. Control negativo (A9 en azul): ausencia de señal. Control positivo Enterovirus (A10 en gris):ausencia de señal. Control positivo Herpes (A11 en naranja): ausencia de señal. Control positivo VZV (A12 en verde): se observa una señal con Ct=32,88.



Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Status	FAM Std/Res	FAM Ct	Alx532 Std/Res	Alx532 Ct	TxR Std/Res	TxR Ct	Alx647 Std/Res	Alx647 Ct
A9	ENHEVA	C-	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	28.15	NEG	0.00	NEG	0.00
A10	ENHEVA	C+ Enterovirus	UNKN	OK	POS	23.14	POS	26.40	NEG	0.00	NEG	0.00
A11	ENHEVA	C+ Herpes	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	28.29	POS	33.15	NEG	0.00
A12	ENHEVA	C+ VZV	UNKN	OK	NEG	0.00	POS	28.04	NEG	0.00	POS	32.88

Gráfica 4 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo Enterovirus, un control positivo Herpes y un control positivo VZV. Control negativo (A9 en azul): se observa una señal con Ct=28,15. Control positivo Enterovirus (A10 en gris):se observa una señal con Ct=26,40. Control positivo Herpes (A11 en naranja): se observa una señal con Ct=28,29. Control positivo VZV (A12 en verde): se observa una señal con Ct=28,04.

10 Control de calidad

Se recomienda que se lleven a cabo controles positivos y negativos cada vez que se realice un análisis.
Cada lote del kit *RealCycler* MEBAVI-G ha sido testado según las especificaciones de la PCR a tiempo real utilizando el equipo *SmartCycler*® (*Cepheid*®).

11 Observaciones

Tabla de compatibilidad de fluoróforos.

Fluoróforo	Fluoróforo alternativo
FAM	
TET	CAL Fluor Gold 540
HEX	JOE, VIC, CAL Fluor Orange 560, Alexa 532
Texas Red	ROX, LC Red 610, CAL Fluor Red 610
Alx647	Cy5, Quasar 670, LC Red 670, ATTO 647N

Fecha de publicación: Septiembre 2012.